



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 115073767 A

(43) 申请公布日 2022.09.20

(21) 申请号 202111363270.5

A61K 47/36 (2006.01)

(22) 申请日 2021.11.17

(71) 申请人 杭州师范大学

地址 311121 浙江省杭州市余杭区余杭塘路2318号

(72) 发明人 于双江 丁笑然 魏舒 孙鸿程
刘俊秋

(74) 专利代理机构 杭州杭诚专利事务所有限公
司 33109

专利代理师 李博

(51) Int. Cl.

C08J 3/075 (2006.01)

C08L 5/02 (2006.01)

C08K 5/48 (2006.01)

A61K 9/06 (2006.01)

权利要求书2页 说明书10页 附图4页

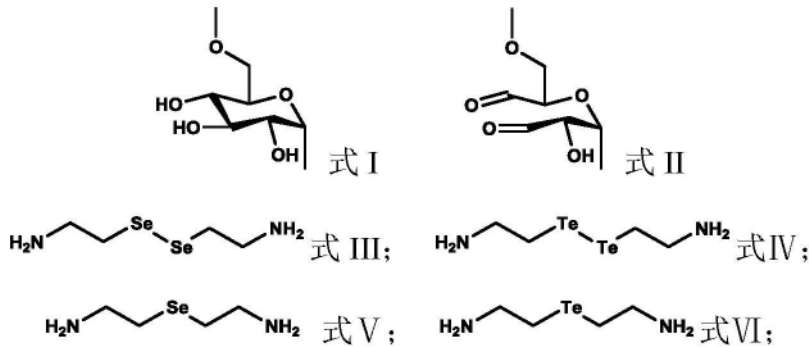
(54) 发明名称

一种具有抗氧化酶活性的葡聚糖水凝胶及制备方法、应用

(57) 摘要

本发明涉及葡聚糖水凝胶技术领域,具体涉及一种具有抗氧化酶活性的葡聚糖水凝胶,包括具有式I结构的第一重复单元、具有式II结构的第二重复单元、以及如式III、IV、V或VI结构中的至少一种的第三单元;第一重复单元聚合度为 x ,第二重复单元聚合度为 y , $0.5 \leq x/y \leq 5$;第三单元与第二重复单元之间经第三单元的 $-NH_2$ 与第二重复单元具有的 $-COH$ 反应形成 $-C=N-$ 键连接。本发明制得的水凝胶具备pH/氧化/还原三重响应性,并具有一定的类过氧化物酶催化活性和过氧化物清除能力,可作为医用辅料应用于生物医学领域。

1. 一种具有抗氧化酶活性的葡聚糖水凝胶,其特征在于,包括具有式I结构的第一重复单元、具有式II结构的第二重复单元、以及如式III、IV、V或VI结构中的至少一种的第三单元;



第一重复单元聚合度为 x ,第二重复单元聚合度为 y , $0.5 \leq x/y \leq 5$;

第三单元与第二重复单元之间经第三单元的 $-NH_2$ 与第二重复单元具有的 $-COH$ 反应形成 $-C=N-$ 键连接。

2. 一种具有抗氧化酶活性的葡聚糖水凝胶的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:

(1) 将葡聚糖部分转化成醛基化葡聚糖,得到含有葡聚糖和醛基化葡聚糖的氧化葡聚糖,醛基化葡聚糖的重复单元的结构式如式II所示;

(2) 将步骤(1)得到的氧化葡聚糖溶于水性溶液中,向其中加入交联剂,并调节pH范围为7.1~7.6,混合均匀得到具有抗氧化酶活性的葡聚糖水凝胶,所用交联剂为带有氨基和硒或带有氨基和碲的化合物。

3. 根据权利要求2所述的制备方法,其特征在于,步骤(1)中所用葡聚糖的分子量为10000~200000g/mol。

4. 根据权利要求2或3所述的制备方法,其特征在于,步骤(1)的转化方法如下:将葡聚糖经pH值为4.0~5.0的磷酸缓冲液溶解,然后避光冰浴下滴加 $NaIO_4$ 溶液,糖单元和 IO_4^- 摩尔比为1.25~3.333:1,搅拌后加入丙三醇,继续搅拌后常温透析、冻干,得到混合体。

5. 根据权利要求2所述的制备方法,其特征在于,步骤(2)中交联剂与混合体的加入量按氨基和醛基的摩尔比计算,氨基与醛基摩尔比为2/3~3/2:1。

6. 根据权利要求2或5所述的制备方法,其特征在于,所述交联剂为如结构式III所示的硒代胱胺、如结构式IV所示的碲代胱胺、如结构式V所示的2,2'-硒代(乙烷-1-胺)、如结构式VI所示的2,2'-碲代(乙烷-1-胺)中的一种或多种。

7. 根据权利要求6所述的制备方法,其特征在于,

硒代胱胺制备过程如下:

(III-1) 合成 Se_2Na_2 和Boc保护的硒代胱胺:取 $NaBH_4$ 和Se粉添加到反应釜中混合,Se粉和 $NaBH_4$ 的摩尔比为1.1~1.2:1,通入氮气置换空气保护,搅拌下加水没过反应物,反应至溶液呈酒红色澄清状态,然后加入Boc保护的溴乙胺,溴乙胺和硼氢化钠的摩尔比为2:1~1.1,保持45~55℃反应20~30h,脱除溶剂后加入二氯甲烷萃取,然后水洗、干燥,过滤,再经二氯甲烷清洗,脱除二氯甲烷,然后过层析柱,再旋蒸得到 Se_2Na_2 和Boc保护的硒代胱胺;

(III-2) 合成硒代胱胺:将 Se_2Na_2 和Boc保护的硒代胱胺加入到含8~12%的三氟乙酸的氯仿溶液中,冰浴搅拌后抽干溶剂,乙醚中沉降后过滤,烘干得产物;

碲代光胺的制备过程如下：

(IV-1) 合成 Te_2Na_2 和Boc保护的碲代胱胺：取 NaBH_4 和Te粉添加到反应釜中混合，Te粉和 NaBH_4 的摩尔比为1.1~1.2:1，通入氮气置换空气保护，搅拌下加水没过反应物，反应至溶液呈酒红色澄清状态，然后加入Boc保护的溴乙胺，溴乙胺和硼氢化钠的摩尔比为2:1~1.1，保持45~55℃反应20~30h，脱除溶剂，加入二氯甲烷萃取，然后水洗、干燥后过滤，再经二氯甲烷清洗，脱除二氯甲烷，然后过层析柱，再旋蒸得到 Te_2Na_2 和Boc保护的碲代胱胺；

(IV-2) 合成碲代胱胺：将 Te_2Na_2 和Boc保护的碲代胱胺加入到含8~12%的三氟乙酸的氯仿溶液中，冰浴搅拌后抽干溶剂，乙醚中沉降后过滤，烘干得产物；

2,2'-硒代(乙烷-1-胺)制备过程如下：

(V-1) 合成 SeNa_2 和Boc保护的2,2'-硒代(乙烷-1-胺)：取 NaBH_4 和Se粉添加到反应釜中混合，Se粉和 NaBH_4 的摩尔比为1:1.1~1.2，通入氮气置换空气保护，搅拌下加水没过反应物，反应至溶液呈无色澄清状态，加入Boc保护的溴乙胺，溴乙胺和Se粉的摩尔比为2:1~1.1，保持45~55℃反应20~30h，脱除溶剂，加入二氯甲烷萃取分离，然后水洗、干燥后经二氯甲烷清洗，脱除二氯甲烷，然后过层析柱，再旋蒸得到 SeNa_2 和Boc保护的2,2'-硒代(乙烷-1-胺)；

(V-2) 合成2,2'-硒代(乙烷-1-胺)：将 SeNa_2 和Boc保护的2,2'-硒代(乙烷-1-胺)加入到含8~12%的三氟乙酸的氯仿溶液中，冰浴搅拌后抽干溶剂，乙醚沉降后过滤，烘干得产物；

2,2'-碲代(乙烷-1-胺)的制备过程如下：

(VI-1) 合成 TeNa_2 和Boc保护的2,2'-碲代(乙烷-1-胺)：取 NaBH_4 和Te粉添加到反应釜中混合，Te粉和 NaBH_4 的摩尔比为1:1.1~1.2，通入氮气置换空气保护，搅拌下加水没过反应物，反应至溶液呈无色澄清状态，然后加入Boc保护的溴乙胺，溴乙胺和Te粉的摩尔比为2:1~1.1，保持45~55℃反应20~30h，脱除溶剂，加入二氯甲烷萃取分离，然后水洗、干燥后经二氯甲烷清洗，脱除二氯甲烷，然后过层析柱，旋蒸得到 TeNa_2 和Boc保护的2,2'-碲代(乙烷-1-胺)；

(VI-2) 合成2,2'-碲代(乙烷-1-胺)：将 TeNa_2 和Boc保护的2,2'-碲代(乙烷-1-胺)加入到含8~12%的三氟乙酸的氯仿溶液中，冰浴搅拌后抽干溶剂，乙醚沉降后过滤，烘干得产物。

8. 根据权利要求7所述的制备方法，其特征在于，Boc保护的溴乙胺的制备过程如下：将溴乙胺溶解于二氯甲烷中，加入二碳酸二叔丁酯Boc，三乙胺TEA，冰浴搅拌6h，萃取，水洗，饱和食盐水洗， Na_2SO_4 干燥，旋蒸，真空干燥，得产物；其中溴乙胺、Boc和TEA的摩尔比为1:1~1.1:3~3.1。

9. 如权利要求1所述的葡聚糖水凝胶或如权利要求2至8任一所述制备方法得到的葡聚糖水凝胶在清除氢过氧化物或清除 H_2O_2 或催化谷胱甘肽GSH转化成GSSG上的应用。

10. 根据权利要求9所述的应用，其特征在于，所述氢过氧化物为脂类氢过氧化物、核酸氢过氧化物或胸腺嘧啶氢过氧化物。

一种具有抗氧化酶活性的葡聚糖水凝胶及制备方法、应用

技术领域

[0001] 本发明涉及葡聚糖水凝胶技术领域,具体涉及一种具有抗氧化酶活性的葡聚糖水凝胶及制备方法、应用。

背景技术

[0002] 水凝胶 (Hydrogel) 是一类含水量较高的三维网络结构,具有高的保水能力,被广泛应用于多种领域,如:抗旱,化妆品、农用薄膜、矿业中的抑尘剂、食品中的保鲜剂、医疗中的药物载体等。其中,水凝胶作为药物载体,已成为疾病局部治疗的有效辅料,通过将药物在病灶部位的直接释放,减少了药物的全身毒副作用及机体环境对敏感类药物在体内被降解和破坏的几率,具有很高的潜在应用价值。

[0003] 目前,常用的水凝胶基质多为具有良好生物相容性的材料,如聚乙二醇 (PEG)、聚乳酸 (PLA) 等。其中,葡聚糖 (又名右旋糖酐、红细胞生成素 (EPO) 等) 是一类具有良好生物相容性的天然高分子多糖材料,在临床上的人工血浆的主要成分,也是一种构筑水凝胶的重要基质材料。环境敏感水凝胶是指自身能感知外界环境的微小变化或刺激 (如温度、pH、氧化还原、光、电、压力等),并能产生相应的物理结构和化学性质变化的一类高分子凝胶,近年来,作为药物载体被广泛研究。

[0004] 微酸性和高水平氧化应激压力是肿瘤微环境的重要生理特征,也是抗肿瘤药物发挥疗效的重要障碍,开发能够对上述微环境特征具有多重响应、并具有ROS清除能力的水凝胶载体材料,对于科学调控药物的肿瘤局部释放行为,提高抗肿瘤治疗效率均具有重要意义。但是,目前兼顾针对上述生理特征的多重响应性水凝胶药物载体制备条件较为复杂,不利于这类材料的临床开发应用。

发明内容

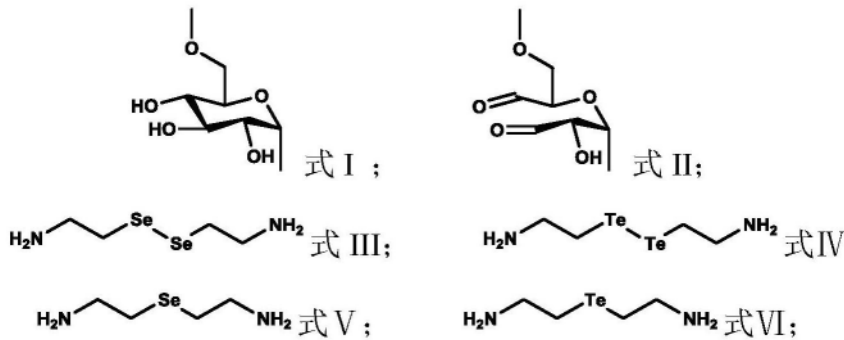
[0005] 为对微酸性、高水平氧化应激压力等微环境特征的多重响应,本发明的目的在于提供一种具有抗氧化酶活性的葡聚糖水凝胶,具有对酸性环境、氧化环境和还原环境的多重响应的特点,而且具有抗氧化酶活性,能够清除过氧化物。

[0006] 本发明的另一目的在于提供上述葡聚糖水凝胶的制备方法。

[0007] 本发明的另一目的在于提供上述葡聚糖水凝胶的应用。

[0008] 本发明提供如下的技术方案:

一种具有抗氧化酶活性的葡聚糖水凝胶,包括具有式I结构的第一重复单元、具有式II结构的第二重复单元、以及如式III、IV、V或VI结构中的至少一种的第三单元;



第一重复单元聚合度为 x ,第二重复单元聚合度为 y , $0.5 \leq x/y \leq 5$;

第三单元与第二重复单元之间经第三单元的 $-NH_2$ 与第二重复单元具有的 $-COH$ 反应形成 $-C=N-$ 键连接。

[0009] 一种具有抗氧化酶活性的葡聚糖水凝胶的制备方法,包括以下步骤:

(1) 将葡聚糖部分转化成醛基化葡聚糖,得到葡聚糖和醛基化葡聚糖的氧化葡聚糖,醛基化葡聚糖的重复单元的结构式如式II所示;

(2) 将步骤(1)得到的氧化葡聚糖溶于水性溶液中,向其中加入交联剂,并调节pH范围为7.1~7.6,混合均匀得到具有抗氧化酶活性的葡聚糖水凝胶,所用交联剂为带有氨基和硒或带有氨基和碲的化合物。

[0010] 作为本发明方法的优选,步骤(1)中所用葡聚糖的分子量为10000~200000g/mol。

[0011] 作为本发明方法的优选,步骤(1)的转化方法如下:将葡聚糖经pH值为4.0~5.0的磷酸缓冲液溶解,然后避光冰浴下滴加 $NaIO_4$ 溶液,糖单元和 IO_4^- 摩尔比为1.25~3.333:1,搅拌后加入丙三醇,继续搅拌后常温透析、冻干,得到氧化葡聚糖。

[0012] 作为本发明方法的优选,步骤(2)中交联剂与氧化葡聚糖的加入量按氨基和醛基的摩尔比计算,氨基与醛基摩尔比为2/3~3/2:1。

[0013] 作为本发明方法的优选,所述交联剂为如结构式III所示的硒代胱胺、如结构式IV所示的碲代胱胺、如结构式V所示的2,2'-硒代(乙烷-1-胺)、如结构式VI所示的2,2'-碲代(乙烷-1-胺)、中的一种或多种。

[0014] 作为本发明方法的优选,硒代胱胺制备过程如下:

(III-1) 合成 Se_2Na_2 和Boc保护的硒代胱胺:取 $NaBH_4$ 和Se粉添加到反应釜中混合,Se粉和 $NaBH_4$ 的摩尔比为1.1~1.2:1,通入氮气置换空气保护,搅拌下加水没过反应物,反应至溶液呈酒红色澄清状态,然后加入Boc保护的溴乙胺,溴乙胺和硼氢化钠的摩尔比为2:1~1.1,保持45~55℃反应20~30h,脱除溶剂后加入二氯甲烷萃取,然后水洗、干燥,过滤,再经二氯甲烷清洗,脱除二氯甲烷,然后过层析柱,再旋蒸得到 Se_2Na_2 和Boc保护的硒代胱胺;

(III-2) 合成碲代胱胺:将 Se_2Na_2 和Boc保护的硒代胱胺加入到含8~12%的三氟乙酸的氯仿溶液中,冰浴搅拌后抽干溶剂,乙醚中沉降后过滤,烘干得产物;

碲代光胺的制备过程如下:

(IV-1) 合成 Te_2Na_2 和Boc保护的碲代胱胺:取 $NaBH_4$ 和Te粉添加到反应釜中混合,Te粉和 $NaBH_4$ 的摩尔比为1.1~1.2:1,通入氮气置换空气保护,搅拌下加水没过反应物,反应至溶液呈酒红色澄清状态,然后加入Boc保护的溴乙胺,溴乙胺和硼氢化钠的摩尔比为2:1

~1.1, 保持45~55℃反应20~30h, 脱除溶剂, 加入二氯甲烷萃取, 然后水洗、干燥后过滤, 再经二氯甲烷清洗, 脱除二氯甲烷, 然后过层析柱, 再旋蒸得到 Te_2Na_2 和Boc保护的碲代胱胺;

(IV-2) 合成碲代胱胺: 将 Te_2Na_2 和Boc保护的碲代胱胺加入到含8~12%的三氟乙酸的氯仿溶液中, 冰浴搅拌后抽干溶剂, 乙醚中沉降后过滤, 烘干得产物;

2,2'-硒代(乙烷-1-胺)制备过程如下:

(V-1) 合成 SeNa_2 和Boc保护的2,2'-硒代(乙烷-1-胺): 取 NaBH_4 和Se粉添加到反应釜中混合, Se粉和 NaBH_4 的摩尔比为1:1.1~1.2, 通入氮气置换空气保护, 搅拌下加水没过反应物, 反应至溶液呈无色澄清状态, 加入Boc保护的溴乙胺, 溴乙胺和Se粉的摩尔比为2:1~1.1, 保持45~55℃反应20~30h, 脱除溶剂, 加入二氯甲烷萃取分离, 然后水洗、干燥后经二氯甲烷清洗, 脱除二氯甲烷, 然后过层析柱, 再旋蒸得到 SeNa_2 和Boc保护的2,2'-硒代(乙烷-1-胺);

(V-2) 合成2,2'-硒代(乙烷-1-胺): 将 SeNa_2 和Boc保护的2,2'-硒代(乙烷-1-胺)加入到含8~12%的三氟乙酸的氯仿溶液中, 冰浴搅拌后抽干溶剂, 乙醚沉降后过滤, 烘干得产物; 2,2'-碲代(乙烷-1-胺)的制备过程如下:

(VI-1) 合成 TeNa_2 和Boc保护的2,2'-碲代(乙烷-1-胺): 取 NaBH_4 和Te粉添加到反应釜中混合, Te粉和 NaBH_4 的摩尔比为1:1.1~1.2, 通入氮气置换空气保护, 搅拌下加水没过反应物, 反应至溶液呈无色澄清状态, 然后加入Boc保护的溴乙胺, 溴乙胺和Te粉的摩尔比为2:1~1.1, 保持45~55℃反应20~30h, 脱除溶剂, 加入二氯甲烷萃取分离, 然后水洗、干燥后经二氯甲烷清洗, 脱除二氯甲烷, 然后过层析柱, 旋蒸得到 TeNa_2 和Boc保护的2,2'-碲代(乙烷-1-胺);

(VI-2) 合成2,2'-碲代(乙烷-1-胺): 将 TeNa_2 和Boc保护的2,2'-碲代(乙烷-1-胺)加入到含8~12%的三氟乙酸的氯仿溶液中, 冰浴搅拌后抽干溶剂, 乙醚沉降后过滤, 烘干得产物。

[0015] 作为本发明方法的优选, Boc保护的溴乙胺的制备过程如下: 将溴乙胺溶解于二氯甲烷中, 加入二碳酸二叔丁酯Boc, 三乙胺TEA, 冰浴搅拌6h, 萃取, 水洗, 饱和食盐水洗, Na_2SO_4 干燥, 旋蒸, 真空干燥, 得产物; 其中溴乙胺、Boc和TEA的摩尔比为1:1~1.1:3~3.1。

[0016] 上述葡聚糖水凝胶或如上述制备方法得到的葡聚糖水凝胶在清除氢过氧化物或清除 H_2O_2 或催化谷胱甘肽GSH转化成GSSG上的应用。可以直接应用, 也可制成相应试剂后使用, 这种试剂的成分可以直接是上述葡聚糖水凝胶, 也可以是含有上述葡聚糖水凝胶, 将上述葡聚糖水凝胶作为医学上可以接受的辅料。

[0017] 作为本发明的优选, 所述氢过氧化物为脂类氢过氧化物、核酸氢过氧化物或胸腺嘧啶氢过氧化物。

[0018] 本发明的有益效果如下:

1) 本发明提供的葡聚糖水凝胶含有席夫碱结构(-C=N-), 并带有硒或碲活性中心, 以席夫碱键作为pH响应单元, 含Se/Te基团作为氧化/还原响应单元, 具有pH/氧化/还原三重响应性, 在微酸环境下、还原环境和氧化环境下均能够发生降解, 满足对微酸性、高水平氧化应激压力等微环境特征的多重响应要求;

2) 本发明提供的葡聚糖水凝胶具有一定的类过氧化物酶催化活性, 能够将GSH转

化成GSSG,同时具有过氧化物清除能力,用于氢过氧化物如脂类氢过氧化物以及双氧水的清除,可作为医用辅料应用于生物医学领域;

3) 本发明提供的水凝胶制备方法反应条件简单、温和、可一步获得结构中同时含有席夫碱及二硒键结构或二碲键结构或单硒结构或单碲结构的水凝胶

附图说明

- [0019] 图1为本发明实施例5制备葡聚糖水凝胶的实物图。
 [0020] 图2为本发明实施例5制得的氧化葡聚糖的核磁表征图。
 [0021] 图3为本发明实施例5制备的葡聚糖水凝胶冷冻干燥样品的扫描电镜图。
 [0022] 图4为本发明实施例5制得的葡聚糖水凝胶在还原环境下的响应性降解曲线图。
 [0023] 图5为本发明实施例5制得的葡聚糖水凝胶在氧化环境下的响应性降解曲线图。
 [0024] 图6为本发明实施例5制备的葡聚糖水凝胶在微酸性环境下的响应性降解曲线图。
 [0025] 图7为本发明实施例5制备的葡聚糖水凝胶的催化活性曲线图。
 [0026] 图8为本发明实施例5制备的葡聚糖水凝胶对 H_2O_2 的清除能力曲线。

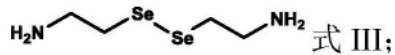
具体实施方式

[0027] 下面就本发明的具体实施方式作进一步说明。

[0028] 如无特别说明,本发明中所采用的原料均可从市场上购得或是本领域常用的,如无特别说明,下述实施例中的方法均为本领域的常规方法。

[0029] 实施例1

交联剂硒代胱胺,结构如式III所示:



其制备过程如下:

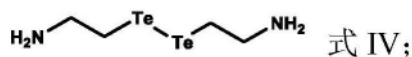
(III-0) 合成Boc(二碳酸二叔丁酯)保护的溴乙胺:取溴乙胺置于二氯中,加入Boc(二碳酸二叔丁酯),TEA(三乙胺),三者摩尔比为溴乙胺:Boc:TEA=1:1:3,冰浴搅拌6h,萃取,水洗,饱和食盐水洗, Na_2SO_4 (硫酸钠)干燥,旋蒸,真空干燥,得产物;

(III-1) 合成 Se_2Na_2 (二硒二钠)和Boc(二碳酸二叔丁酯)保护的硒代胱胺:取 $NaBH_4$ (硼氢化钠)和Se粉于三颈瓶中(Se粉与 $NaBH_4$ 的摩尔比为1.1:1),加入磁子,三颈瓶两端连接氨瓶,一侧用于加入 H_2O ,一侧加用于入Boc(二碳酸二叔丁酯)保护的溴乙胺的四氢呋喃溶液,并给整体装置通换 N_2 ;先加水没过反应物,反应半个小时,溶液呈酒红色澄清状态说明反应完全,然后加Boc保护的溴乙胺的四氢呋喃溶液, $NaBH_4$ 和溴乙胺的摩尔比为1:2,50°C下反应24h,旋蒸除溶剂,二氯萃取产物后水洗,然后 Na_2SO_4 干燥,过滤干燥剂,二氯清洗干燥剂,旋蒸脱除过滤后溶液中的二氯甲烷,过硅胶柱分离,旋蒸得产物;

(III-2) 合成硒代胱胺:将Boc保护的硒代胱胺加入到含有10%的三氟乙酸的氯仿溶液中,冰浴搅拌4h脱除Boc,抽干溶剂,在乙醚中沉降一晚,过滤,烘干得产物。

[0030] 实施例2

[0029] 交联剂碲代胱胺,结构式如式IV所示:



其制备过程如下

(IV-1) 合成 Te_2Na_2 和Boc保护的碲代胱胺:取 NaBH_4 和Te粉于三颈瓶中(Te粉与 NaBH_4 的摩尔比为1:1:1),三颈瓶两端连接氨瓶,一侧用于加入 H_2O ,一侧用于加入Boc保护的溴乙胺的四氢呋喃溶液,给整体装置通换 N_2 ;先加水没过反应物,反应半个小时,溶液呈酒红色澄清状态说明反应完全,然后加Boc保护的溴乙胺的四氢呋喃溶液, NaBH_4 和溴乙胺的摩尔比为1:2,50℃下反应24h,旋蒸除溶剂,二氯萃取产物后水洗,然后 Na_2SO_4 干燥,过滤干燥剂,二氯清洗干燥剂,旋蒸脱除过滤后的二氯甲烷,过硅胶柱,旋蒸得产物;

(IV-2) 合成碲代胱胺:将Boc保护的碲代胱胺加入到含有10%的三氟乙酸的氯仿溶液中,冰浴搅拌4h脱除Boc,抽干溶剂,在乙醚中沉降过夜,过滤,烘干得产物。

[0031] 实施例3

交联剂2,2'-硒代(乙烷-1-胺),其结构式如式V所示:



其制备过程如下:

(V-1) 合成 SeNa_2 和Boc保护的2,2'-硒代(乙烷-1-胺):取 NaBH_4 和Se粉于三颈瓶中(Se粉与 NaBH_4 的摩尔比为1:1:1),三颈瓶两端连接氨瓶,一侧用于加入 H_2O ,一侧用于加入Boc保护的溴乙胺的四氢呋喃溶液,整体装置通换 N_2 ;先加水没过反应物反应半个小时,溶液呈无色澄清状态说明反应完全,然后加Boc保护的溴乙胺,Se粉和溴乙胺的摩尔比为1:2,50℃下反应24h,旋蒸除溶剂,二氯萃取产物后水洗,然后 Na_2SO_4 干燥,过滤干燥剂,二氯清洗干燥剂,旋蒸脱除过滤后溶液中的二氯甲烷,过硅胶柱,旋蒸得产物;

(V-2) 合成2,2'-硒代(乙烷-1-胺):将Boc保护的2,2'-硒代(乙烷-1-胺)加入到含有10%的三氟乙酸的氯仿溶液中脱除Boc,冰浴搅拌4h,抽干溶剂,在乙醚中沉降一晚,过滤,烘干得产物。

[0032] 实施例4

交联剂2,2'-碲代(乙烷-1-胺),其结构式如式VI所示:



(VI-1) 合成 TeNa_2 和Boc保护的2,2'-碲代(乙烷-1-胺):取适量 NaBH_4 和Te粉于三颈瓶中(Te粉与 NaBH_4 的摩尔比为1:1:1),加入磁子,三颈瓶两端连接氨瓶,一侧用于加入 H_2O ,一侧用于加入Boc保护的溴乙胺的四氢呋喃溶液,整体装置通换 N_2 ;先加水没过反应物反应半个小时,溶液呈无色澄清状态说明反应完全,然后加Boc保护的溴乙胺,Te粉和溴乙胺的摩尔比为1:2,50℃下反应24h,旋蒸除溶剂,二氯萃取产物后水洗,然后 Na_2SO_4 干燥,过滤干燥剂,二氯清洗干燥剂,旋蒸脱除过滤后溶液中的二氯甲烷,过硅胶柱,旋蒸得产物;(VI-2) 合成2,2'-碲代(乙烷-1-胺):将Boc保护的2,2'-碲代(乙烷-1-胺)加入到含有10%的三氟乙酸的氯仿溶液中,冰浴搅拌4h脱除Boc,抽干溶剂,在乙醚中沉降一晚,过滤,烘干得产物。

[0033] 下述各实施例所用交联剂均由上述实施例1-4对应制备得到。

[0034] 实施例5

(1) 氧化葡聚糖的制备:

室温下将5g葡聚糖(分子量为100000g/mol)溶解在50mL去离子水中,油浴加热20min至澄清透明,得到葡聚糖水溶液,冷却至室温后加入高碘酸钠获得混合溶液,混合溶

液中糖单元与高碘酸钠中 IO_4^- 的摩尔比为2.5:1,室温、避光条件下搅拌1.5h,随后加入丙三醇搅拌30min,将所得溶液透析3天,透析时每3h换一次水,透析完成后冷冻干燥,得到醛基化程度约为56%(即每100个糖单元中有56个被氧化)的氧化葡聚糖固体;

(2) 将步骤(1)得到的氧化葡聚糖固体0.075g溶于1.0mL去离子水中,制得浓度为75mg/mL的氧化葡聚糖溶液;室温下取出500 μL 溶液,向其中加入浓度为1g/mL的硒代胱胺水溶液21.0 μL (醛基/氨基摩尔比约为1:1),然后加入10.6 μL NaOH溶液(0.5g/mL)调节溶液pH值至8.0,混合均匀5min,制得具有抗氧化酶活性的葡聚糖水凝胶,如图1所示,呈淡黄色固体状。

[0035] 实施例6

(1) 氧化葡聚糖的制备:

室温下将5g葡聚糖(分子量为10000g/mol)溶解在50mL去离子水中,加热至完全溶解,得到葡聚糖水溶液,冷却至室温后,滴加高碘酸钠溶液,混合溶液中糖单元与高碘酸钠中 IO_4^- 的摩尔比为3.333:1,室温、避光条件下搅拌1.5h,随后加入丙三醇搅拌30min,将所得混合溶液透析3天,每6h换一次水,透析完成后冷冻干燥,得到醛基化程度约为30%(即每100个糖单元中有30个被氧化)的氧化葡聚糖固体;

(2) pH/氧化/还原三重响应性水凝胶的制备:

将步骤(1)得到的氧化葡聚糖固体0.075g溶于1.0mL去离子水中,制得浓度为75mg/mL的氧化葡聚糖溶液。室温下取出500 μL 溶液,向其中加入适量浓度为1g/mL的硒代胱胺水溶液(确保醛基/氨基摩尔比约为1.5:1),然后加入适量NaOH溶液(0.5g/mL)调节溶液pH值至8.0,混合均匀5min,制得具有抗氧化酶活性的葡聚糖水凝胶。

[0036] 实施例7

(1) 氧化葡聚糖的制备:

室温下将5g葡聚糖(分子量为200000g/mol)溶解在50mL去离子水中,油浴加热20min至澄清透明,得到葡聚糖水溶液,冷却至室温后加入高碘酸钠获得混合溶液,混合溶液中糖单元与高碘酸钠中 IO_4^- 的摩尔比为2:1,室温、避光条件下搅拌1.5h,随后加入丙三醇搅拌30min,将所得溶液透析3天,透析时每3h换一次水,透析完成后冷冻干燥,得到醛基化程度约为50%(即每100个糖单元中有50个被氧化)的氧化葡聚糖固体;

(2) pH/氧化/还原三重响应性水凝胶的制备:

将步骤(1)得到的氧化葡聚糖固体0.075g溶于1.0mL去离子水中,制得浓度为75mg/mL的氧化葡聚糖溶液;室温下取出500 μL 溶液,向其中加入适量浓度为1g/mL的硒代胱胺水溶液(确保醛基/氨基摩尔比约为1:1.5),然后加入适量NaOH溶液(0.5g/mL)调节溶液pH值至8.0,混合均匀5min,制得具有抗氧化酶活性的葡聚糖水凝胶。

[0037] 实施例8

(1) 氧化葡聚糖的制备:

室温下将5g葡聚糖(分子量为10000g/mol)溶解在50mL去离子水中,油浴加热20min至澄清透明,得到葡聚糖水溶液,冷却至室温后加入高碘酸钠获得混合溶液,混合溶液中糖单元与高碘酸钠中 IO_4^- 的摩尔比为3.333:1,室温、避光条件下搅拌1.5h,随后加入丙三醇搅拌30min,将所得溶液透析3天,透析时每3h换一次水,透析完成后冷冻干燥,得到醛基化程度约为30%(即每100个糖单元中有30个被氧化)的氧化葡聚糖固体;

(2) pH/氧化/还原三重响应性水凝胶的制备:

将步骤(1)得到的氧化葡聚糖固体0.075g溶于1.0mL去离子水中,制得浓度为75mg/mL的氧化葡聚糖溶液;室温下取出500 μ L溶液,向其中加入适量浓度为1g/mL的碲代胱胺水溶液(确保醛基/氨基摩尔比约为1.5:1),然后加入适量NaOH溶液(0.5g/mL)调节溶液pH值至8.0,混合均匀5min,制得具有抗氧化酶活性的葡聚糖水凝胶。

[0038] 实施例9

(1) 氧化葡聚糖的制备:

室温下将5g葡聚糖(分子量为100000g/mol)溶解在50mL去离子水中,油浴加热20min至澄清透明,得到葡聚糖水溶液,冷却至室温后加入高碘酸钠获得混合溶液,混合溶液中糖单元与高碘酸钠中 IO_4^- 的摩尔比为2.5:1,室温、避光条件下搅拌1.5h,随后加入丙三醇搅拌30min,将所得溶液透析3天,透析时每3h换一次水,透析完成后冷冻干燥,得到醛基化程度约为40%(即每100个糖单元中有40个被氧化)的氧化葡聚糖固体;

(2) pH/氧化/还原三重响应性水凝胶的制备:

将步骤(1)得到的氧化葡聚糖固体0.075g溶于1.0mL去离子水中,制得浓度为75mg/mL的氧化葡聚糖溶液;室温下取出500 μ L溶液,向其中加入适量浓度为1g/mL的碲代胱胺水溶液(确保醛基/氨基摩尔比约为1:1),然后加入适量NaOH溶液(0.5g/mL)调节溶液pH值至8.0,混合均匀5min,制得具有抗氧化酶活性的葡聚糖水凝胶。

[0039] 实施例10

(1) 氧化葡聚糖的制备:

室温下将5g葡聚糖(分子量为200000g/mol)溶解在50mL去离子水中,油浴加热20min至澄清透明,得到葡聚糖水溶液,冷却至室温后加入高碘酸钠获得混合溶液,混合溶液中糖单元与高碘酸钠中 IO_4^- 的摩尔比为2:1,室温、避光条件下搅拌1.5h,随后加入丙三醇搅拌30min,将所得溶液透析3天,透析时每3h换一次水,透析完成后冷冻干燥,得到醛基化程度约为50%(即每100个糖单元中有50个被氧化)的氧化葡聚糖固体;

(2) pH/氧化/还原三重响应性水凝胶的制备:

将步骤(1)得到的氧化葡聚糖固体0.075g溶于1.0mL去离子水中,制得浓度为75mg/mL的氧化葡聚糖溶液;室温下取出500 μ L溶液,向其中加入适量浓度为1g/mL的碲代胱胺水溶液(确保醛基/氨基摩尔比约为1:1.5),然后加入适量NaOH溶液(0.5g/mL)调节溶液pH值至8.0,混合均匀5min,制得pH/氧化/还原三重响应性水凝胶。

[0040] 实施例11

(1) 氧化葡聚糖的制备:

室温下将5g葡聚糖(分子量为10000g/mol)溶解在50mL去离子水中,油浴加热20min至澄清透明,得到葡聚糖水溶液,冷却至室温后加入高碘酸钠获得混合溶液,混合溶液中糖单元与高碘酸钠中 IO_4^- 的摩尔比为3.333:1,室温、避光条件下搅拌1.5h,随后加入丙三醇搅拌30min,将所得溶液透析3天,透析时每3h换一次水,透析完成后冷冻干燥,得到醛基化程度约为30%(即每100个糖单元中有30个被氧化)的氧化葡聚糖固体;

(2) pH/氧化/还原三重响应性水凝胶的制备:

将步骤(1)得到的氧化葡聚糖固体0.075g溶于1.0mL去离子水中,制得浓度为75mg/mL的氧化葡聚糖溶液;室温下取出500 μ L溶液,向其中加入适量浓度为1g/mL的2,2'-

硒代(乙烷-1-胺)水溶液(确保醛基/氨基摩尔比约为1.5:1),然后加入适量NaOH溶液(0.5g/mL)调节溶液pH值至8.0,混合均匀5min,制得pH/氧化/还原三重响应性水凝胶。

[0041] 实施例12

(1) 氧化葡聚糖的制备:

室温下将5g葡聚糖(分子量为100000g/mol)溶解在50mL去离子水中,油浴加热20min至澄清透明,得到葡聚糖水溶液,冷却至室温后加入高碘酸钠获得混合溶液,混合溶液中糖单元与高碘酸钠中 IO_4^- 的摩尔比为2.5:1,室温、避光条件下搅拌1.5h,随后加入丙三醇搅拌30min,将所得溶液透析3天,透析时每3h换一次水,透析完成后冷冻干燥,得到醛基化程度约为40%(即每100个糖单元中有40个被氧化)的氧化葡聚糖固体;

(2) pH/氧化/还原三重响应性水凝胶的制备:

将步骤(1)得到的氧化葡聚糖固体0.075g溶于1.0mL去离子水中,制得浓度为75mg/mL的氧化葡聚糖溶液;室温下取出500 μL 溶液,向其中加入适量浓度为1g/mL的2,2'-硒代(乙烷-1-胺)水溶液(确保醛基/氨基摩尔比约为1:1),然后加入适量NaOH溶液(0.5g/mL)调节溶液pH值至8.0,混合均匀5min,制得具有抗氧化酶活性的葡聚糖水凝胶。

[0042] 实施例13

(1) 氧化葡聚糖的制备:

室温下将5g葡聚糖(分子量为200000g/mol)溶解在50mL去离子水中,油浴加热20min至澄清透明,得到葡聚糖水溶液,冷却至室温后加入高碘酸钠获得混合溶液,混合溶液中糖单元与高碘酸钠中 IO_4^- 的摩尔比为2:1,室温、避光条件下搅拌1.5h,随后加入丙三醇搅拌30min,将所得溶液透析3天,透析时每3h换一次水,透析完成后冷冻干燥,得到醛基化程度约为50%(即每100个糖单元中有50个被氧化)的氧化葡聚糖固体;

(2) pH/氧化/还原三重响应性水凝胶的制备:

将步骤(1)得到的氧化葡聚糖固体0.075g溶于1.0mL去离子水中,制得浓度为75mg/mL的氧化葡聚糖溶液;室温下取出500 μL 溶液,向其中加入适量浓度为1g/mL的2,2'-硒代(乙烷-1-胺)水溶液(确保醛基/氨基摩尔比约为1:1.5),然后加入适量NaOH溶液(0.5g/mL)调节溶液pH值至8.0,混合均匀5min,制得具有抗氧化酶活性的葡聚糖水凝胶。

[0043] 实施例14

(1) 氧化葡聚糖的制备:

室温下将5g葡聚糖(分子量为10000g/mol)溶解在50mL去离子水中,油浴加热20min至澄清透明,得到葡聚糖水溶液,冷却至室温后加入高碘酸钠获得混合溶液,混合溶液中糖单元与高碘酸钠中 IO_4^- 的摩尔比为3.333:1,室温、避光条件下搅拌1.5h,随后加入丙三醇搅拌30min,将所得溶液透析3天,透析时每3h换一次水,透析完成后冷冻干燥,得到醛基化程度约为30%(即每100个糖单元中有30个被氧化)的氧化葡聚糖固体;

(2) pH/氧化/还原三重响应性水凝胶的制备:

将步骤(1)得到的氧化葡聚糖固体0.075g溶于1.0mL去离子水中,制得浓度为75mg/mL的氧化葡聚糖溶液;室温下取出500 μL 溶液,向其中加入适量浓度为1g/mL的2,2'-硒代(乙烷-1-胺)水溶液(确保醛基/氨基摩尔比约为1.5:1),然后加入适量NaOH溶液(0.5g/mL)调节溶液pH值至8.0,混合均匀5min,制得具有抗氧化酶活性的葡聚糖水凝胶。

[0044] 实施例15

(1) 氧化葡聚糖的制备:

室温下将5g葡聚糖(分子量为100000g/mol)溶解在50mL去离子水中,油浴加热20min至澄清透明,得到葡聚糖水溶液,冷却至室温后加入高碘酸钠获得混合溶液,混合溶液中糖单元与高碘酸钠中 IO_4^- 的摩尔比为2.5:1,室温、避光条件下搅拌1.5h,随后加入丙三醇搅拌30min,将所得溶液透析3天,透析时每3h换一次水,透析完成后冷冻干燥,得到醛基化程度约为40%(即每100个糖单元中有40个被氧化)的氧化葡聚糖固体;

(2) pH/氧化/还原三重响应性水凝胶的制备:

将步骤(1)得到的氧化葡聚糖固体0.075g溶于1.0mL去离子水中,制得浓度为75mg/mL的氧化葡聚糖溶液;室温下取出500 μL 溶液,向其中加入适量浓度为1g/mL的2,2'-砒代(乙烷-1-胺)水溶液(确保醛基/氨基摩尔比约为1:1),然后加入适量NaOH溶液(0.5g/mL)调节溶液pH值至8.0,混合均匀5min,制得具有抗氧化酶活性的葡聚糖水凝胶。

[0045] 实施例16

(1) 氧化葡聚糖的制备:

室温下将5g葡聚糖(分子量为200000g/mol)溶解在50mL去离子水中,油浴加热20min至澄清透明,得到葡聚糖水溶液,冷却至室温后加入高碘酸钠获得混合溶液,混合溶液中糖单元与高碘酸钠中 IO_4^- 的摩尔比为2:1,室温、避光条件下搅拌1.5h,随后加入丙三醇搅拌30min,将所得溶液透析3天,透析时每3h换一次水,透析完成后冷冻干燥,得到醛基化程度约为50%(即每100个糖单元中有50个被氧化)的氧化葡聚糖固体;

(2) pH/氧化/还原三重响应性水凝胶的制备:

将步骤(1)得到的氧化葡聚糖固体0.075g溶于1.0mL去离子水中,制得浓度为75mg/mL的氧化葡聚糖溶液;室温下取出500 μL 溶液,向其中加入适量浓度为1g/mL的2,2'-砒代(乙烷-1-胺)水溶液(确保醛基/氨基摩尔比约为1:1.5),然后加入适量NaOH溶液(0.5g/mL)调节溶液pH值至8.0,混合均匀5min,制得具有抗氧化酶活性的葡聚糖水凝胶。

[0046] 性能测试

1、氧化葡聚糖的C=O峰表征

将实施例5制备的氧化葡聚糖进行核磁表征,图谱如图2所示。从图中可以看出,6.4ppm-7.0ppm处为醛基C=O的峰,表明在葡聚糖分子中成功引入醛基。

[0047] 2、微观结构表征

将实施例5制备的氧化葡聚糖进行SEM扫描电镜测试,结果如图3所示。从图中可以看出,该水凝胶材料微观结构上具有多孔海绵状结构。

[0048] 3、对还原环境的响应测试

将实施例5制得的水凝胶置于浓度为10mM的GSH溶液中,置于恒温水浴锅(37 $^{\circ}\text{C}$)中,按照预定的时间进行凝胶质量的测定,如图4所示,表明该水凝胶材料在GSH溶液中发生了降解,降解速度快于在0.9wt%的氯化钠盐水中,GSH转化为GSSG,可验证该水凝胶具有一定的还原响应性。

[0049] 4、对氧化环境的响应测试

将实施例5制得的水凝胶置于浓度为10mM的 H_2O_2 溶液中,置于恒温水浴锅(37 $^{\circ}\text{C}$)中,按照预定的时间进行凝胶质量的测定,如图5所示,表明该水凝胶材料在 H_2O_2 溶液中发生了降解,且降解速度快于在0.9wt%的氯化钠盐水中,可验证该水凝胶具有一定的氧化响应

性。

[0050] 5、对微酸环境的响应测试将实施例5制得的水凝胶置于pH为5.0的缓冲溶液中,置于恒温水浴锅(37℃)中,按照预定的时间进行凝胶质量的测定,如图6所示,表明该水凝胶材料在酸性环境中发生了降解,且降解速度快于在0.9%的氯化钠盐水中,可验证该水凝胶具有一定的pH响应性。

[0051] 6、催化活性测试

测试体系总体积为500 μ L,首先加入350 μ L的PBS缓冲液(50mmol/L)、50 μ L的TNB(3-羧基-4-硝基苯磺酚溶液)(100 μ mol/L,溶于pH=7.0,20mmol/L的PBS缓冲液中)以及50 μ L硒代胱胺盐酸盐溶液(10mmol/L,37℃)下保温5分钟,分别加入50 μ L的不同浓度的H₂O₂启动反应。通过测试TNB在410nm处吸收值的降低,进而可计算出TNB被H₂O₂氧化的反应速率(v_0)。酶活力定义为每分钟氧化1 μ M TNB所需酶量,单位是 μ mol \cdot min⁻¹ μ mol⁻¹。如图7所示,吸光度值降低,表明该水凝胶具有一定的谷胱甘肽过氧化物酶催化活性。

[0052] 7、过氧化物清除能力测试

将制得的水凝胶置于10mM的H₂O₂中,测H₂O₂在一段时间内含量的变化,如图8所示,表明该水凝胶对过氧化氢具有一定的清除能力。

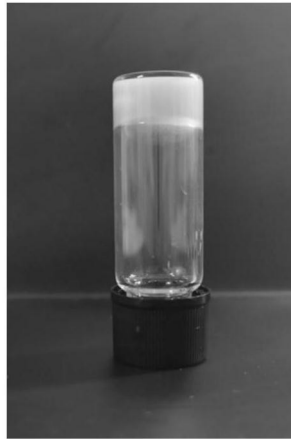


图1

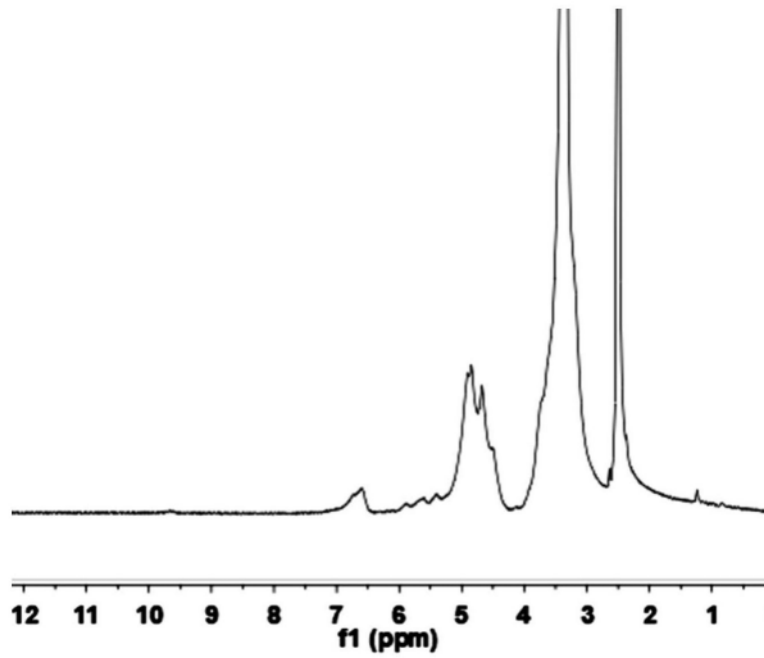


图2

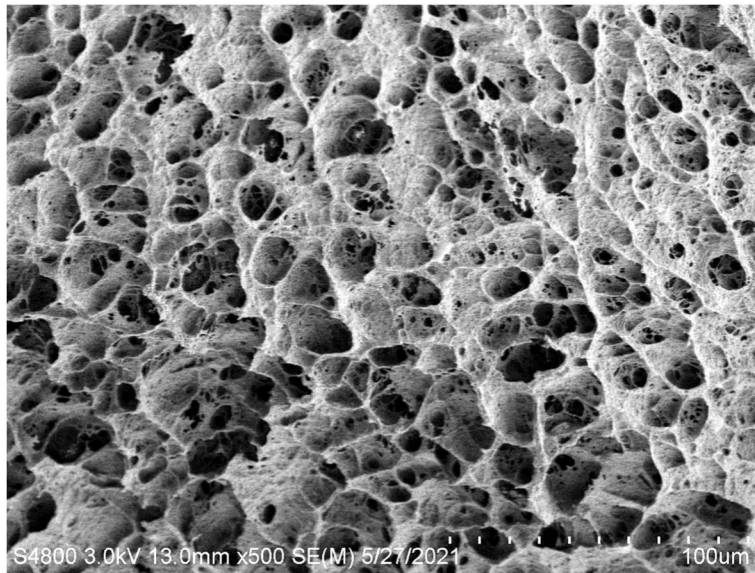


图3

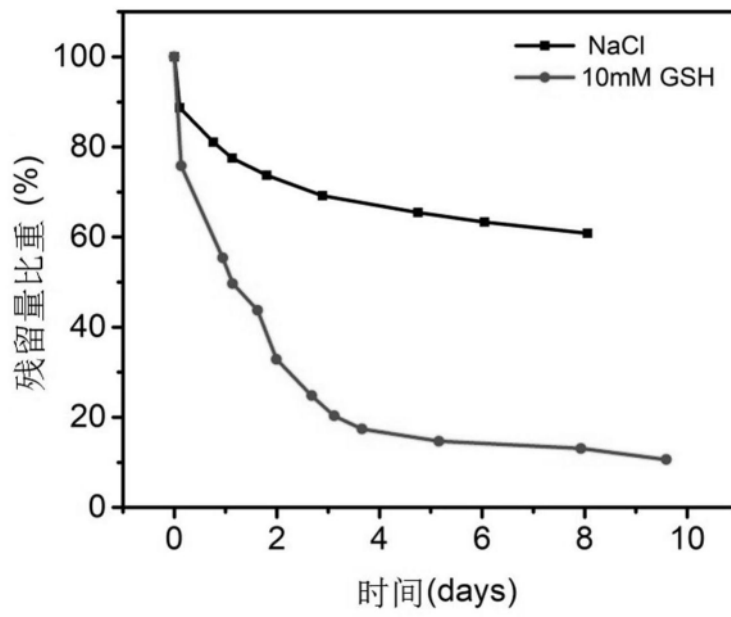


图4

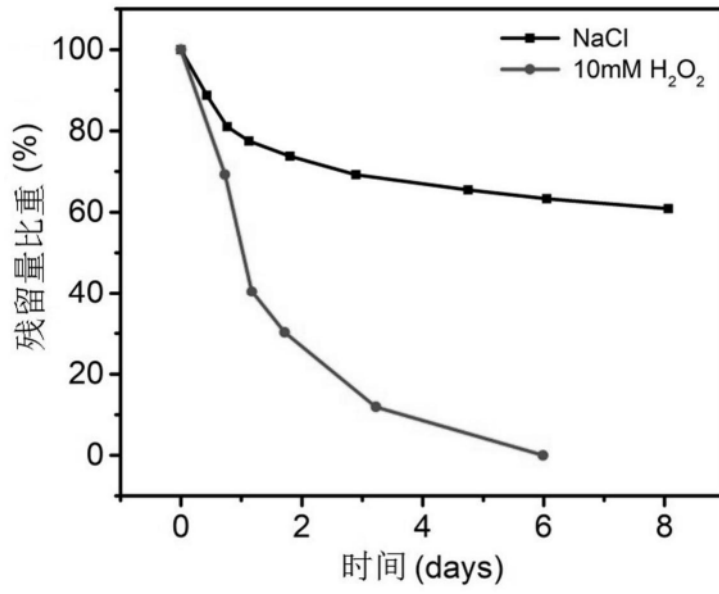


图5

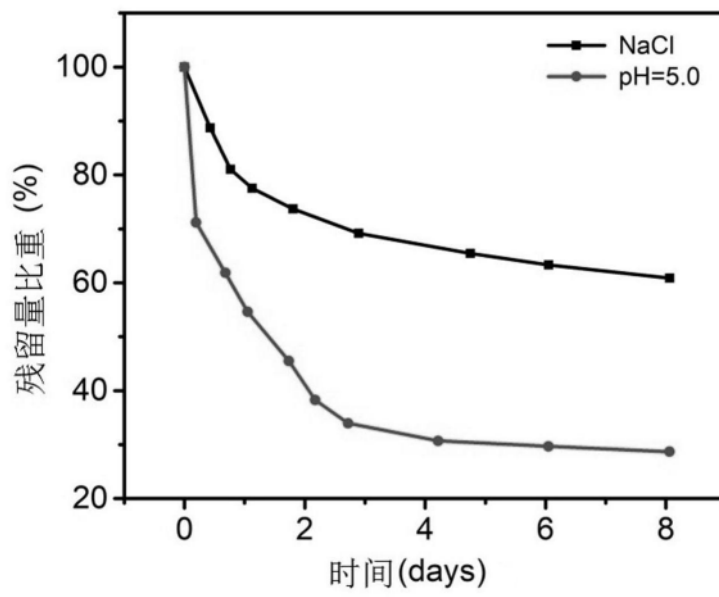


图6

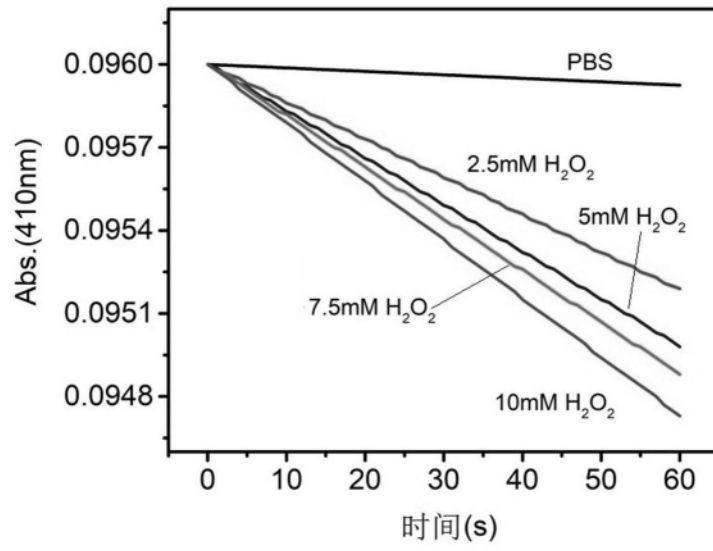


图7

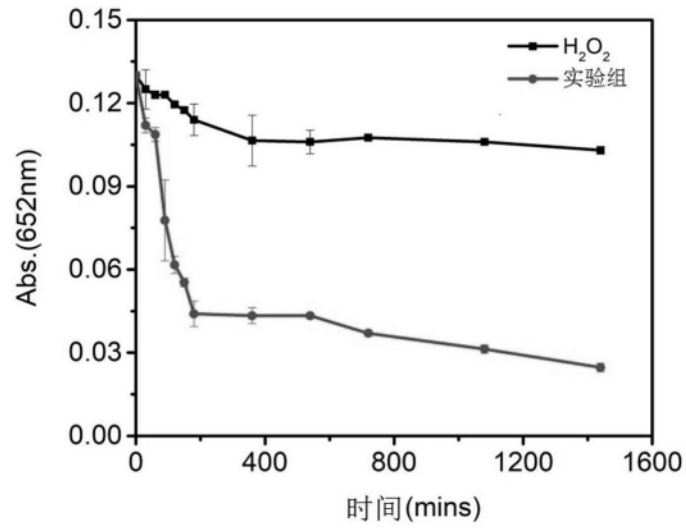


图8